

# Nanopartículas Biodegradables con Anticuerpos Monoclonales en su Superficie y Clorambucilo en su Interior Penetran Células de B-LLC. Nueva Posibilidad Terapéutica.

Dres. Marín GH<sup>1</sup>, Drago H<sup>1</sup>, Sturla F<sup>1</sup>, Olaiz N<sup>1</sup>, Ibar R<sup>1</sup>, Nuñez L<sup>2</sup>, Mansilla E<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> CUCAIBA, Ministerio de Salud Provincia de Bs. As. Argentina.

<sup>2</sup> Argonne Laboratory, Univesidad de Chicago, IL, USA

*“Trabajo Remitido en Octubre 2007”*



ARTÍCULO  
ORIGINAL

HEMATOLOGIA, Vol. 12 Nº 1:  
Enero - Abril, 2008

## INTRODUCCIÓN

Las neoplasias hematológicas son enfermedades que se originan en células hematopoyéticas anormales, las cuales ya sea por su ventaja proliferativa y rápida reproducción (como en el caso de las leucemias agudas) o bien porque existen alteraciones en el proceso de desarrollo, maduración o apoptosis (como en el caso de las leucemias crónicas) sufren una acumulación anormal en el organismo <sup>(1)</sup>.

La Leucemia Linfática Crónica de células B (LLC-B) sigue siendo la leucemia del adulto más frecuente y sin tratamiento curativo definitivo por el momento <sup>(2)</sup>. Las nuevas drogas y los anticuerpos monoclonales entre otros, han representado verdaderos avances farmacológicos, pero en general los efectos colaterales son frecuentes y la aparición de resistencia o recidiva es inevitable <sup>(3)</sup>. La quimioterapia resulta aún una alternativa válida para el tratamiento o la reducción de la masa tumoral <sup>(4)</sup>. Los conceptos de Gompertz <sup>(5)</sup>, Goldie & Coldman <sup>(6)</sup>, y Skipper<sup>(7)</sup>, han resultado de enorme aporte para planificar la administración de los diversos medicamentos antineoplásicos. A partir de ellos, ahora sabemos que si la masa tumoral es grande, el ritmo de crecimiento se enlentece resultando irracional la utilización de fármacos fase específica; que debemos asociar las distintas drogas para evitar la resistencia; o bien que al eliminarse una fracción constante de células, los fármacos deben administrarse en ciclos secuenciales <sup>(8)</sup>. Por otro lado, existe una verdad irrefutable: cualquier antineoplásico es capaz de eliminar a cualquier célula tumoral, si se administra en las concentraciones adecuadas <sup>(9)</sup>. Sin embargo, la limitación está dada por los efectos adversos que provocarían dichas dosis sobre las células normales.

Los anticuerpos monoclonales han aportado un enorme avance en la terapéutica ya que focalizan en el blanco hacia el cual van dirigidos, no obstante, actúan por saturación, siendo muchas veces limitados sus efectos sobre enfermedades con gran masa tumoral como lo es la LLC-B <sup>(10)</sup>.

El objetivo del fármaco ideal en esta patología sería entonces, lograr someter a las células LLC a una dosis apoptótica del mismo, personalizando el efecto solo en ellas, sin involucrar a las células sanas, minimizando así los efectos adversos, y maximizando los resultados esperados, especialmente en aquellas situaciones donde se ha desarrollado resistencia a drogas.

Resulta entonces prioritario desarrollar nuevas modalidades terapéuticas y así incrementar las posibilidades de los fármacos anti-LLC ya existentes, aportando una mayor actividad biológica y una mayor especificidad.

La nanotecnología, ciencia que estudia, desarrolla y emplea sistemas complejos de escala nanométrica, podría ser la clave para mejorar los resultados tanto diagnósticos como terapéuticos en oncología pero muy especialmente en onco-hematología y LLC-B <sup>(11)</sup>. Las nanopartículas, objetos de un tamaño de decenas a centenas de nanómetros, construidas con diferentes materiales y/o polímeros naturales o sintéticos, podrían ser diseñadas casi a medida para cada enfermedad <sup>(12)</sup> y muy especialmente para B-LLC. Las drogas son pasibles de disolverse y encapsularse dentro de una “cáscara” de matriz polimérica. De acuerdo a como sean producidas, podrán controlar la liberación del fármaco incorporado <sup>(13)</sup>. La introducción de drogas en ellas, permite dirigirlas para que cumplan acciones terapéuticas programadas. En la actualidad hay varios mode-

los polímero-proteína y varios conjugados polímero-fármaco en fase clínica, pero salvo un solo trabajo de investigación realizado con nanopartículas de oro <sup>(14)</sup> no existe ningún otro relato o producto en la literatura mundial para el tratamiento de la LLC con nanopartículas biodegradables (NPB) como las aquí presentadas. La Nanotecnología permitirá pues el desarrollo de nuevas terapias potencialmente curativas. La posibilidad de adherir anticuerpos monoclonales específicos en la superficie de las nanopartículas, permitirá dirigir selectivamente a éstas contra los componentes antigénicos específicos de las células tumorales y así facilitar su internalización por endocitosis y posterior liberación de su carga de drogas o las combinaciones más efectivas de las mismas, en el citoplasma de cada una de las células malignas, disminuyéndose así los efectos colaterales y proveyendo potencialmente, grandes cantidades de medicamento intracelular, aún de aquellos que tengan grandes dificultades de biodisponibilidad o farmacocinética para alcanzar concentraciones antitumorales útiles, venciendo de esta manera el mecanismo de resistencia tumoral y trasuntar en un aumento en la sobrevida de los pacientes.

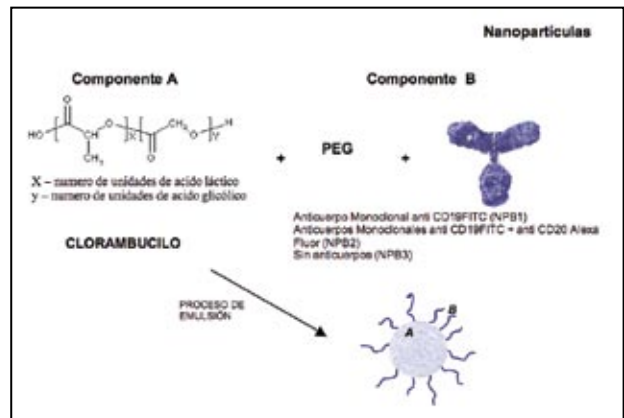
**OBJETIVOS**

Demostrar la penetración en células de LLC-B resistentes a fármacos de nanopartículas biodegradables cargadas con clorambucilo y recubiertas con anticuerpos monoclonales específicos, y establecer el grado de apoptosis y citotoxicidad provocado por las mismas.

**MATERIALES Y MÉTODOS**

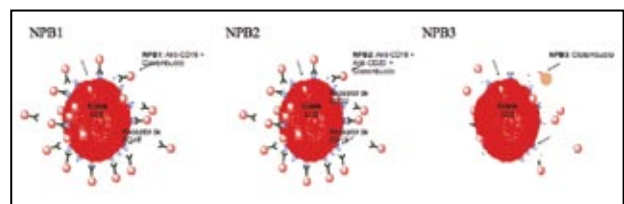
*Formación de Nanopartículas:* Se fabricaron tres tipos de nanopartículas biodegradables (NPB) con un polímero a base de Poly-Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) recubierto con Polietilenglicol (PEG) por un proceso original de emulsión (BioTarget Nanotech, Chicago, Illinois, USA). Sobre la superficie de estas nanopartículas se incorporaron distintos anticuerpos monoclonales y durante el proceso de producción fueron cargadas con clorambucilo (Figuras 1 y 2). Al primer tipo de partícula (NPB1) se le acopló un anticuerpo monoclonal anti CD19 marcado con FITC (Biologends, USA), excitación en 495 nm/emisión en 525 nm; al segundo grupo de partículas (NPB2) se le adhirieron dos anticuerpos monoclonales de distinta especificidad en la misma partícula: anti CD19/FITC (Biologends, USA) excitación en 495 nm/emisión en 525 nm y anti CD20/Alexa Fluor 700 (Biologends, USA), excitación 675nm/emisión 700 nm, y a las terceras (NPB3) no se les adhirió ningún monoclonal pero sí FITC. La cantidad de anticuerpo monoclonal

**Figura 1.** Formación de la Nanopartícula.



NPB1: nanopartícula con Clorambucilo y anti-CD19; NPB2: nanopartícula con Clorambucilo, anti-CD19 y anti-CD20; NPB3: sin monoclonal.

**Figura 2.** Tipo de Nanopartículas.



NPB1: nanopartícula con Clorambucilo y anti-CD19; NPB2: nanopartícula con Clorambucilo, anti-CD19 y anti-CD20; NPB3: sin monoclonal.

anti CD19 y anti CD20 fue de 5,34 y 5,38 µg por mg de polímero utilizado respectivamente. Todas las partículas llevaban disuelto como fármaco activo en su interior clorambucilo a una concentración de 8 µg por mg de polímero. El diámetro efectivo de los distintos sistemas de NPB fue determinado mediante DLS (Dynamic Light Scattering). Asimismo se determinó el potencial Zeta de las NPB para conocer su carga superficial. Las NPB fueron suspendidas en PBS/10% BSA (Albúmina Bovina Sérica) con una concentración de masa total final de 900 ug/ml. De estas soluciones se tomaron alícuotas para todos los ensayos.

*Modelos celulares:* Se obtuvieron células leucémicas de una paciente con B-LLC estadio Rai 4, CD19, CD20, CD5, CD23, CD38/Zap70 positivas previamente tratada y resistente a multi drogas (incluyendo el clorambucilo). Asimismo se obtuvieron linfocitos normales B y T de un donante sano para formar parte de los cultivos controles.

*Cultivos celulares:* Fueron realizados cultivos celulares con células LLC-B, linfocitos B normales

o linfocitos T en presencia de NPB1, NPB2, NPB3, clorambucilo, monoclonales solos (anti-CD19, anti-CD19/CD20), PBS/BSA o bien medio de cultivo solo. Cada ensayo se realizó por triplicado cultivando 1 ml de RPMI-1640/10% SFB con 5 ul de cada partícula y  $1 \times 10^5$  células en cada placa de cultivo a 37°C, en tiempos de incubación de 15 minutos, 24 y 48 hs.

**Penetración:** Al final de cada incubación se observó la localización de las nanopartículas con microscopio confocal con distintos láseres específicos para el tipo de emisión de cada fluorocromo, y se fotografió con cámara digital, objetivándose el grado de penetración de cada partícula tanto en las células normales B y T como en las LLC-B.

**Apoptosis y Citotoxicidad:** Se evaluó el grado de apoptosis y de muerte de cada tipo de célula generada por cada uno de los tipos de NPB a una concentración de 5 ul/ml de medio, así como también por clorambucilo solo (a una concentración de 50  $\mu\text{mol/L}$ ); FITC-anti-CD19, CD20/Alexa Fluor, PBS/BSA, y medio sin partícula. El grado de apoptosis y mortalidad se determinó mediante técnica de citometría de flujo a través de la marcación de las células a estudiar con Anexina V y Ioduro de Propidio a 0, 24 y 48 hs de cultivo y por técnica de coloración vital (Acridine orange/bromuro de etidio) y conteo en microscopio de inmunofluorescencia respectivamente. Para las fotografías digitales con microscopía confocal los preparados fueron teñidos con el colorante fluorescente DAPI (4'-6-diamidino-2-fenylindole) para visualizar núcleos apoptóticos. Las diferencias halladas en los distintos ensayos fueron analizadas utilizando el test de t Student con un límite del 5% para significación estadística.

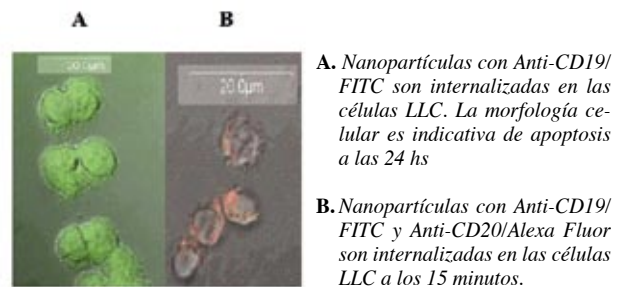
## RESULTADOS

La distribución por tamaño de los tres tipos de sistemas de Nanopartículas anticuerpos monoclonales en la superficie mediante Dynamic Light Scattering resultó en un diámetro efectivo de 301 y 311 nm para las NPB 1 y 2 respectivamente. Las partículas número 3 sin monoclonal adherido demostraron un diámetro efectivo de 255 nm. La medición del potencial Zeta de los distintos tipos de NPB y de sus respectivas cargas de superficie demostró que todas las nanopartículas tienen una carga de superficie ligeramente negativa a un pH cercano a 7.

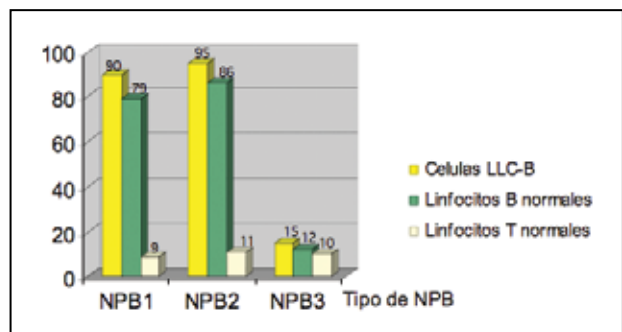
Tanto las partículas número 1 con anti-CD19 como aquellas número 2, con ambos anticuerpos anti-CD19 y anti-CD20, demostraron penetrar eficientemente células de LLC-B (Figura 3) así como linfocitos B normales en forma significativamente mayor ( $p < 0.001$ ) que las NPB3 sin monoclonales (Figura 4). Se observó un máximo de internalización de 95% de las células LLC

y 86% de los linfocitos B normales al cabo de 24 hs con las partículas número 2 (Figura 4). En los ensayos a 15 minutos se pudo apreciar mayor penetración de partículas en células LLC que en los linfocitos B normales (38 vs 21%), observándose una mayor internalización de las partículas número 2. Las partículas sin monoclonal mostraron una ligera penetración (15% en 24 hs). No se observó internalización importante de ninguna de las partículas sobre linfocitos T normales (Figura 4).

**Figura 3.**



**Figura 4.** Penetración de Nanopartículas.



NPB1: Polímero+clorambucilo +CD19; NPB2: Polímero+clorambucilo +CD19+CD20; NPB3: Polímero+clorambucilo

En células LLC-B: NPB2 vs NPB1  $p < 0.05$ ; NPB2 vs NPB3  $p < 0.001$ , NPB1 vs NPB3  $p < 0.001$

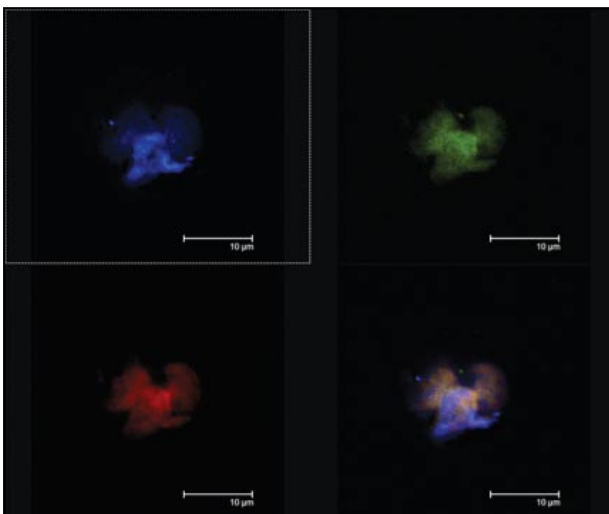
En células B normales: NPB2 vs NPB1  $p < 0.07$ ; NPB2 vs NPB3  $p < 0.001$ , NPB1 vs NPB3  $p < 0.001$

En células T: NPB2 vs NPB1  $p < 0.7$ ; NPB2 vs NPB3  $p < 0.8$  NPB1 vs NPB3  $p < 0.7$

Signos celulares de apoptosis mediante tinción con DAPI fueron apreciados en células LLC incubadas con partículas 2 y observadas bajo microscopía confocal (figura 5). Por citometría de flujo en cada cultivo específico al inicio y a las 24 horas (Figura 6), se observó un grado de apoptosis significativamente mayor ( $p < 0.001$ ) con las BNP 1 y 2 sobre células leucémicas (76% y 87% respectivamente) que sobre linfocitos B normales (45% y 57%) con concentraciones de 5 ul de partículas/ml de medio de cultivo a 24 horas. Las partículas 1 y 2 indujeron aproximadamente 4 veces más apoptosis en las células B malignas resistentes testeadas que el clorambucilo solo a una concentración de

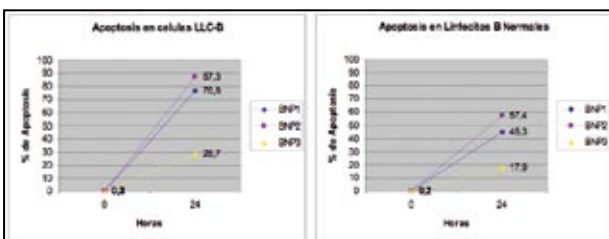
50  $\mu\text{mol/L}$ , la cual es suficiente para generar citotoxicidad in Vitro en células no resistentes (Figura 7). Los anticuerpos anti-CD19-FITC, CD20/Alexa Fluor, y el PBS/BSA o RPMI 1640/SFB solos no produjeron ningún efecto apoptótico tanto en las células leucémicas o en las normales. Muy poca fluorescencia (15%) o apoptosis (29%) se observó en las células LLC incubadas por 24 hs con 5  $\mu\text{l/ml}$  de nanopartículas sin monoclonal. Los resultados de los ensayos de citotoxicidad realizados in vitro demostraron que las nanopartículas conjugadas tanto a CD19 o CD19/CD20 tienen similar citotoxicidad contra las células de LLC a 48 hs (71% y 79% respectivamente), y ambas tuvieron significativamente mayor citotoxicidad que las nanopartículas sin anticuerpos (28.7%) ( $p < 0.001$ ) (Fig8).

**Figura 5.** Internalización de las distintas Nanopartículas.



Imágenes obtenidas con Microscopio Confocal mostrando las interacciones de las células de LLC con las BNP2 cargadas con droga. Arriba a la izquierda células LLC con fluorescencia por DAPI reflejando el progreso del proceso de apoptosis luego de 24 hs de tratamiento en incubación con BNP2. Arriba a la derecha fluorescencia emitida por el anti CD19/FITC y abajo a la izquierda la emisión del anti CD20/Alexa fluor internalizados en las BNP2. Abajo a la derecha la superposición de todos los tipos de fluorescencia.

**Figura 6.** Apoptosis en células LLC-B y células normales con 5  $\mu\text{l}$  de NPB.



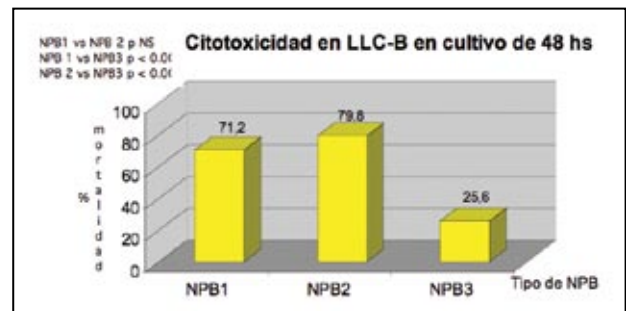
Las figuras muestra la apoptosis obtenida a las 24 hs de cultivo en cada tipo celular (linfocitos B normales y células LLC).

**Figura 7.** Análisis comparativo de la apoptosis objetiva en células LLC-B según el tipo de cultivo en el cual se incluyeron.



Las diferencias estadísticas observadas entre las células cultivadas en presencia de partículas NPB 1 y 2 con el resto de los cultivos objetivaron una  $p < 0.001$ .

**Figura 8.**



La figura muestra los valores promedio de la citotoxicidad obtenida en cada uno de los cultivos (realizados por triplicado) en presencia de cada tipo de nanopartícula biodegradable (NPB), siendo NPB1 el polímero+clorambucilo+anticuerpo anti-CD19; NPB2 polímero+clorambucilo+anticuerpo anti-CD19/CD20; y NPB3 polímero+clorambucilo sin anticuerpo.

## DISCUSIÓN

Existe una gran cantidad de fármacos que se han ensayado en la LLC. Los más clásicos como los agentes alquilantes han demostrado cierta eficacia en el control de la cifra leucocitaria, aunque no se han conseguido remisiones a largo plazo (15-16). Los análogos de las purinas han logrado remisiones parciales aún en los fracasos con agentes alquilantes, sin embargo las mismas tampoco son duraderas (17-18). Lamentablemente la resistencia dosis-dependiente tanto para alquilantes como análogos de las purinas es frecuente, y el incremento de dichas dosis provoca toxicidad y segundas neoplasias que desalientan esta alternativa (19). La concentración plasmática lograda por los distintos fármacos antineoplásicos es la responsable de los

efectos beneficiosos y adversos de los mismos. Al incrementar y mantener los niveles de droga en contacto con las células neoplásicas las posibilidades de eliminarlas se incrementan. Sin embargo, el plasma cargado con fármaco llega sin selectividad a todo el organismo, generando efectos tóxicos en los tejidos nobles<sup>(20)</sup>. La toxicidad causada por la intensificación terapéutica por ejemplo, ha llevado al rescate con células madre hematopoyéticas con el fin de reducir los efectos nocivos de la medicación utilizada sobre la médula ósea<sup>(21)</sup>. Sin embargo, los efectos no deseados sobre otros tejidos, son aún difíciles de mitigar.

Basados en la expresión antigénica que poseen las células de la LLC<sup>(22-23)</sup>, se han iniciado la búsqueda de nuevos fármacos con mayor selectividad sobre las células tumorales, siendo esta una de las líneas más importante de investigación<sup>(24-25)</sup>. No obstante, los resultados, si bien promisorios, no lograron eliminar los últimos vestigios de la clona, y las recaídas siguen siendo inevitables.

La provisión selectiva de fármacos dentro de células tumorales es una de las líneas mencionadas que lidera la investigación en nanomedicina.

Cada célula de B-LLC expresa aproximadamente 3000 epítopes CD20 y otros tantos CD19<sup>(22,23)</sup>. Estos pueden ser la puerta de entrada celular selectiva de nanopartículas biocompatibles y biodegradables recubiertas en su superficie con anticuerpos monoclonales específicos y cargadas en su interior con distintas drogas o combinaciones de las mismas como ha sido demostrado en este trabajo. En esta investigación se demuestra por primera vez la penetración de este tipo de nanopartículas al citosol de las células leucémicas LLC-B; produciendo un efecto apoptótico sobre células resistentes a multifármacos, sugiriéndose entonces que estas nanopartículas funcionales pueden ser "carriers" de fármacos útiles para el tratamiento de la LLC. La poca penetración y apoptosis de las nanopartículas sin monoclonales sería consistente con su bajo grado de unión no selectiva a las células.

La citotoxicidad de las nanopartículas depende de la endocitosis de las partículas cargadas con clorambucilo mediada por receptor para CD19 o CD20.

Resultará interesante ensayar otros tipos drogas vehiculizadas por nanopartículas con anticuerpos monoclonales con efecto predominante sobre las células leucémicas y menor acción sobre los linfocitos B normales.

Las drogas a transportar de esta forma tienen una limitación y es que no deben necesitar que en su totalidad requieran convertirse a metabolito activo, ya que las mismas serán introducidas directamente en la célula blanco sin posibilidad de acceso a hígado u otro órgano metabolizador.

En ese sentido nuestro grupo está actualmente experimentando con Hidroxicloroquina en el mismo modelo de LLC presentado en este trabajo. Los antimaláricos como la Hidroxicloroquina, son potentes compuestos antiproliferativos y podrían activar mecanismos de apoptosis independientes de p53 induciendo permeabilización de membranas lisosomales<sup>(26)</sup>. Nuestros datos indicarían que nanopartículas con anticuerpos monoclonales anti-CD19 cargadas con hidroxicloroquina podrían producir apoptosis selectiva e importante de células B de LLC resistente a drogas a bajas concentraciones respetando los linfocitos B normales abriéndose de esta manera una terapéutica eficaz y poco tóxica para el tratamiento de la LLC.

Los resultados de estos estudios serán sin dudas sumamente útiles en LLC así como en todas aquellas otras enfermedades neoplásicas con expansión clonal B así como seguramente también en aquellas de origen autoinmune. El paso inicial que se muestra en el presente trabajo es de suma importancia, ya que la internalización de las nanopartículas y su impacto en apoptosis en células LLC, son condición sine qua non para continuar con los futuros estudios en esta y otras patologías oncohematológicas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Reed JC. Molecular biology of chronic lymphocytic leukaemia. **Semin Oncol** 1998; 25: 11-18.
2. Robak T. Therapy of chronic lymphocytic leukemia with purine analogs and monoclonal antibodies. **Transfus Apher Sci** 2005;32(1):33-44
3. Faderl S, O'Brien S, Keating MJ. Monoclonal antibody combinations in CLL: evolving strategies. **Best Pract Res Clin Haematol.** 2006;19(4):781-93
4. Bryd JC, Rai KR, Sausville EA, Grever MR. Old and new therapies in chronic lymphocytic leukemia: now is the time for a reassessment of therapeutic goals. **Semin Oncol** 1998; 25:65-74.
5. Norton L. Predicting the course of Gompertzian growth. **Nature** 1976; 264:542-49.
6. Goldie JH, Coldman AJ. Quantitative model for multiple levels of drug resistance in clinical tumors. **Cancer Treat Rep** 1983; 67: 923-7.
7. Skipper HE, Schabel FM, Wilcox WS. Experimental evaluation of potential anticancer agents. On the criteria and kinetic associated with curability of experimental leukaemia. **Cancer Chemother Rep** 1964; 35: 1-9.
8. Crown J, Norton L Potential strategies for improving the results of high-dose chemotherapy in patients with cancer **Ann Oncol.** 1995;6 Suppl 4:21-6.
9. De Vita VT, Young RC, Canellos GP. Combination versus single agent chemotherapy. Review of the basis of selection of drug treatment of cancer. **Cancer** 1975; 35: 98-109.
10. van Der Velden VH, te Marvelde JG, Hoogeveen PG, Bernstein ID, Houtsmuller AB, Berger MS, van Dongen JJ. Targeting of the CD33-calicheamicin immunoconjugate Mylotarg in acute myeloid leukemia: in vivo and in vitro saturation and internalization by leukemic and normal myeloid cells. **Blood.** 2001; 97(10):3197-204
11. Vicent MJ & Duncan R. Polymer conjugates: nanosized medicines for treating cancer. **Trends Biotechnol.** 2005; 24: 39-47

12. Ferrari M. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. **Nature Rev. Cancer** 2005; 5: 161-171.
13. Moses M A, Brem H & Langer R. Advancing the field of drug delivery: taking aim at cancer. **Cancer Cell** 2003; 4: 337-341.
14. Mukherjee P, Bhattacharya R, Bone N, Lee YK, Patra CR, Wang S, Lu L, Secreto C, Banerjee PC, Yaszemski MJ, Kay NE, Mukhopadhyay D. Potential therapeutic application of gold nanoparticles in B-chronic lymphocytic leukemia (BCLL): enhancing apoptosis J Nanobiotechnology. 2007; 5:4-11.
15. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S et al: National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. **Blood** 1996, 87: 4990-4997.
16. Robak T, Kasznicki M.: Alkylating agents and nucleoside analogues in the treatment of B cell chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia**. 2002;16(6):1015-27.
17. Tam CS, O'brien S, Lerner S, Khouri I, Ferrajoli A, Faderl S, Browning M, Tsimberidou AM, Kantarjian H, Wierda WG: The natural history of fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia patients who fail alemtuzumab or have bulky lymphadenopathy. **Leuk Lymphoma** 2007;48(10):1931-9.
18. Silber R, Degar B, Costin D, Newcomb EW, Mani M, Rosenberg CR, Morse L, Drygas JC, Canellakis ZN, Potmesil M: Chemosensitivity of lymphocytes from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia to chlorambucil, fludarabine, and camptothecin analogs. **Blood** 1994; 84(10):3440-6
19. Zhong Y, Bakke AC, Fan G, Braziel RM, Gatter KM, Leis JF, Maziarz RT, Huang JZ: Drug resistance in B-cell chronic lymphocytic leukemia: predictable by in vitro evaluation with a multiparameter flow cytometric cytotoxicity assay. **Cytometry B Clin Cytom.** 2007;72(3):189-95.
20. Vogel EW, Barbin A, Nivard MJ, Stack HF, Waters MD, Lohman PH. Heritable and cancer risks of exposures to anticancer drugs: inter-species comparisons of covalent deoxyribonucleic acid-binding agents. **Mutat Res** 1998;400(1-2):509-40.
21. Kharfan-Dabaja MA, Kumar A, Behera M, Djulbegovic B. Systematic review of high dose chemotherapy and autologous haematopoietic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukaemia: what is the published evidence? **Br J Haematol.** 2007 Oct;139(2):234-42
22. Witzig TE, Li C-Y, Tefferi A. Measurement of the intensity of cell surface antigen expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **A J Pathol** 1994;101:312-17.
23. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R and Catovsky D: Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. **J Clin Pathol** 1998; 51;364-369.
24. Plosker GL, Figgitt DP Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. **Drugs** 2003; 63(8):803-43
25. Atkins J. H. & Gershell L. J. Selective anticancer drugs. **Nature Rev. Cancer** 2002; 1: 645-646.
26. Lagneaux L., Delforge A., Carlier S., Massy M., Bernier M. and Bron D.: Early induction of apoptosis in B-chronic lymphocytic leukaemia cells by hydroxychloroquine: activation of caspase-3 and no protection by survival factors. **British Journal of Haematology** 2001; 112: 344-352.